

Received: 2013.07.04
Accepted: 2014.08.19
Published: 2014.04.12

Charakterystyka i znaczenie biologiczne mikropęcherzyków błonowych*

Characterization and biological role of extracellular vesicles

Aneta Wójtowicz, Monika Baj-Krzyworzeka, Jarosław Baran

Zakład Immunologii Klinicznej, Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
w Krakowie

Streszczenie

Mikropęcherzyki błonowe (EV – extracellular vesicles) są zróżnicowaną populacją, najczęściej kulistych struktur błonowych uwalnianych przez komórki, w tym również komórki nowotworowe zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. Ich wielkość waha się od 30 nm do 1 µm, a rozmiar jest jednym z głównych wyznaczników podziału EV na dwie kategorie: mniejszych (30-100 nm) i bardziej jednorodnych egzosomów (exosomes) oraz większych (0,1-1 µm) zwanych mikrofragmentami błonowymi (microvesicles) lub ektosomami. Obecność EV stwierdzono w wielu płynach ustrojowych człowieka: krwi, moczu, ślinie, nasieniu i płynie owodniowym. Powstawanie EV jest ściśle kontrolowane, a ich funkcja oraz skład biochemiczny zależą od właściwości i rodzaju komórek, z których pochodzą. EV będąc nośnikami bioaktywnych cząsteczek, takich jak białka, mRNA i mikroRNA mogą odgrywać istotną rolę w komunikacji międzykomórkowej oraz modulacji funkcji, m.in. komórek układu odpornościowego. Ponadto na EV pochodzenia nowotworowego (TMV – tumour-derived microvesicles) zwanych onkosomami, zidentyfikowano markery nowotworowe charakterystyczne dla komórek nowotworowych, co wskazuje, że TMV mogą odgrywać istotną rolę w procesie wzrostu guza i rozwoju choroby nowotworowej. Jednak obecność na powierzchni TMV charakterystycznych markerów komórek nowotworowych może być potencjalnie wykorzystana w diagnostyce jako źródło biomarkerów pomocnych w ocenie rokowania oraz może służyć do opracowania nowych schematów leczenia chorych nowotworowych z zastosowaniem celowanej immunoterpii.

Słowa kluczowe:

mikropęcherzyki błonowe • mikropęcherzyki błonowe pochodzenia nowotworowego • egzosomy • ektosomy • onkosomy

Summary

Extracellular vesicles (EV) form a heterogeneous population of mostly spherical membrane structures released by almost all cells, including tumour cells, both *in vivo* and *in vitro*. Their size varies from 30 nm to 1 µm, and size is one of the main criteria of the selection of two categories of EV: small (30-100 nm), more homogeneous exosomes and larger fragments (0.1-1 µm) called membrane microvesicles or ectosomes. The presence of EV has already been detected in many human body fluids: blood, urine, saliva, semen and amniotic fluid. Formation of EV is tightly controlled, and their function and biochemical composition depend on the cell type they originate from. EV are the “vehicles” of bioactive molecules, such as proteins, mRNA and microRNA, and may play an important role in intercellular communication and modulation

*Praca finansowana ze środków projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki nr N N401 616040.

Key words:	of e.g. immune system cell activity. In addition, on the surface of tumour-derived microvesicles (TMV), called oncosomes, several markers specific for cancer cells were identified, which indicates a role of TMV in tumour growth and cancer development. On the other hand, TMV may be an important source of tumour-associated antigens (TAA) which can be potentially useful as biomarkers with prognostic value, as well as in development of new forms of targeted immunotherapy of cancer. extracellular vesicles • tumour-derived microvesicles • exosomes • ectosomes • oncosomes
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1130655
Word count:	3449
Tables:	–
Figures:	5
References:	68

Adres autora: dr hab. Jarosław Baran, Zakład Immunologii Klinicznej, Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii UJ CM, ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków; e-mail: mibaran@cyf-kr.edu.pl

Wykaz skrótów: **Aex** – egzozomy pochodzące z wysięku nowotworowego (ascites derived – exosomes), **ATP** – adenozyno-5-trifosforan, **CRC** – rak jelita grubego (colorectal cancer), **CDDP** – cisplatyna (cis-diamminedichloroplatinum (II)), **DC** – komórki dendrytyczne (dendritic cells), **Dex** – egzozomy pochodzące z komórek dendrytycznych (dendritic cell derived-exosomes), **ECM** – macierz zewnątrzkomórkowa (extracellular matrix), **EMMPRIN** – induktor metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (extracellular matrix metalloproteinase inducer), **ESCRT** – endosomalny kompleks sortujący (endosomal sorting complex required for transport), **EV** – mikropęcherzyki błonowe (extracellular vesicles), **GM-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów i granulocytów (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), **HGF** – czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor), **HLA-A2** – antygen A2 głównego układu zgodności tkankowej człowieka (human leukocyte antigen HLA-A2), **HSP** – białka szoku cieplnego (heat shock proteins), **ICAM** – cząsteczka adhezji międzykomórkowej (intercellular adhesion molecule), **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana przez mitogen (mitogen-activated protein kinases), **MDR** – oporność wielolekowa (multi-drug resistance), **MFGE8** – laktadheryna (milk fat globule EGF/factor VIII), **MHC** – główny układ zgodności tkankowej (major histocompatibility complex), **MV** – mikrofragmenty błonowe (microvesicles), **MVB** – ciało wielopęcherzykowe (multivesicular body), **PCA3** – antygen 3 raka stercza (prostate cancer antigen 3), **PMV** – mikrofragmenty błonowe pochodzenia płytkowego (platelet-derived microvesicles), **PS** – fosfatydyloseryna, **PSA** – swoisty antygen stercza (prostate specific antigen), **Tex** – egzozomy pochodzenia nowotworowego (tumour derived-exosomes), **TGF-β** – transformujący czynnik wzrostu typu β (transforming growth factor β), **TMV** – pęcherzyki błonowe pochodzenia nowotworowego (tumour-derived microvesicles), **TRAIL** – białko TRAIL (tumour necrosis factor-related apoptosis inducing ligand), **uPA** – urokinazowy aktywator plazminogenu (urokinase plasminogen activator), **VCAM** – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń (vascular adhesion molecule), **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor), **VEGFR** – receptor dla czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor receptor)

WSTĘP

Opisanie przez Wolfa w 1967 r. w ludzkiej krwi małych struktur wytwarzanych przez aktywowane płytki krwi i wykazujących działanie prokoagulacyjne, a określonych wówczas jako „pył płytkowy” (platelet dust) [65], zapoczątkowało lawinę badań dotyczących powstawania tzw. mikropęcherzyków błonowych (EV – extracellular vesicles) i ich roli w organizmie. Dziś wiadomo, że większość

komórek ma zdolność do uwalniania EV, a ich obecność stwierdzono m.in. w moczu, krwi, płynie owodniowym, ślinie, czy nasieniu [38,39,42]. Mechanizm powstawania EV jest ściśle kontrolowany i różny w zależności od ich rodzaju [10]. Skład biochemiczny EV i ich rola w dużej mierze zależą od właściwości komórek, z których pochodzą. EV będąc nośnikami bioaktywnych cząsteczek, takich jak: białka, mRNA i mikroRNA zdają się odgrywać istotną rolę w komunikacji międzykomórkowej [33,37,59]. EV wy-

Tabela 1. Kryteria podziału mikropęcherzyków błonowych (EV; wg [36] zmodyfikowano)

Nazwa	Rozmiar	Gęstość	Pochodzenie
Egzosomy (exosomes)	30-100 nm	1,1-1,19 g/cm ³	ciała wielopęcherzykowe (MVB)
Pęcherzyki egzozomopodobne (exosomes like)	30-90 nm		ciała wielopęcherzykowe (MVB)
Ektosomy/Mikrofragmenty błonowe (ectosomes/microvesicles)	0,1-1 µm	ok. 1,16 g/cm ³	błona komórkowa
Ciała apoptotyczne (apoptotic blebs)		1,24-1,28 g/cm ³	błona komórkowa

stępują powszechnie w krwi obwodowej zdrowych osób, a ich poziom wzrasta w przebiegu niektórych schorzeń ogólnoustrojowych, np. miażdżycy, chorób autoimmunologicznych czy nowotworowych [9,12,21,22,39,61].

Obecnie wiele uwagi poświęca się potencjalnej roli EV w progresji choroby nowotworowej. Prowadzone badania mają na celu zweryfikowanie roli obecnych na EV antygenów, zwłaszcza tych pochodzenia nowotworowego. Występowanie swoistych biomarkerów i dokładne poznanie mechanizmów decydujących o obecności bądź braku danego białka na powierzchni EV może w niedalekiej przyszłości umożliwić efektywne wykorzystanie tej wiedzy w diagnostyce onkologicznej i/lub terapii chorób nowotworowych [15,33,37,38,39].

W pracy przedstawiono szczegółową charakterystykę EV, ich budowę, klasyfikację, potencjalne właściwości oraz możliwości wykorzystania, ze szczególnym uwzględnieniem mikropęcherzyków pochodzenia nowotworowego (TMV – tumour-derived microvesicles).

CHARAKTERYSTYKA MIKROPĘCHERZYKÓW BŁONOWYCH

Terminologia i klasyfikacja

Mikropęcherzyki błonowe są zróżnicowaną populacją, najczęściej kulistych struktur błonowych (pęcherzyków) uwalnianych zarówno przez komórki eukariotyczne, jak i prokariotyczne, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Ich wielkość waha się od 30 nm do 1 µm, a rozmiar i pochodzenie są głównymi wyznacznikami klasyfikacji EV. Chociaż EV na ogół wykazują podobną budowę [29], to występują również zasadnicze różnice dotyczące m.in. wspomnianego już rozmiaru, mechanizmu i źródła ich powstawania oraz właściwości fizykochemicznych [10,15]. Różnice te doprowadziły do wyodrębnienia dwóch głównych rodzajów EV: mniejszych, bardziej jednorodnych pęcherzyków nazwanych egzozomami (exosomes) oraz większych – ektosomów (ectosomes). Egzozomy są nanometrowej wielkości (30-100 nm), sferycznymi pęcherzykami, zawierającymi białka, mRNA, mikroRNA oraz lipidy [10,15,32]. Drugą,

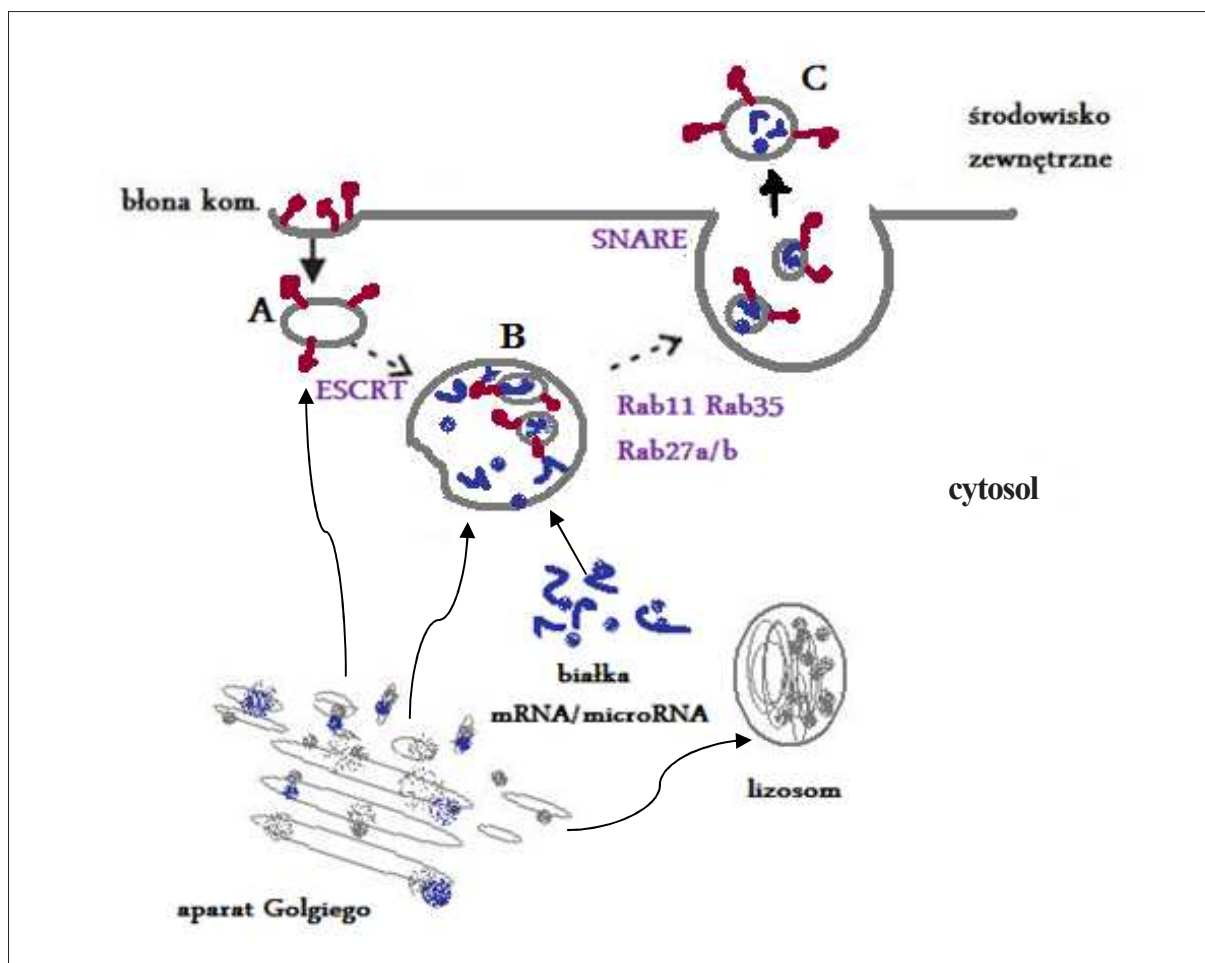
bardziej zróżnicowaną grupę stanowią pęcherzyki większych rozmiarów (0,1-1 µm), zwane mikrofragmentami błonowymi (MV – microvesicles) lub ektosomami (ectosomes), wydzielanymi na zewnątrz komórki bezpośrednio przez błonę komórkową [18,21].

Przedstawiony podział pozwala usystematyzować zebraną dotychczas wiedzę na temat EV i umożliwia precyzyjniejsze porównywanie wyników różnych badań. Jednak należy zaznaczyć, iż przyjęta powszechnie terminologia nastrocza wiele trudności, co jest związane z ciągłym pojawianiem się nowych odkryć w tej dziedzinie, a co za tym idzie z dynamiczną zmianą nomenklatury. W celu dokładniejszej identyfikacji, wyróżnia się dodatkowe rodzaje EV (patrz tab. 1).

Mechanizm powstawania EV

Mechanizm tworzenia EV oraz ich transport do przestrzeni zewnątrzkomórkowej w zależności od typu pęcherzyków jest różny [10,18,48]. Egzozomy powstają przez wpuklenie błony do światła późnych endosomów. Powstające struktury są nazywane ciałkami wielopęcherzykowymi (MVB – multivesicular body). Egzozomy zawierają charakterystyczne dla komórki rodzicielskiej proteiny i/lub kwasy nukleinowe (mRNA, mikroRNA). Wykazano, że podczas transportu egzozomów w cytosolu, jak i w kompartmentach MVB istotną rolę odgrywa kompleks białkowy tzw. ESCRT (endosomal sorting complex required for transport), który bierze udział w „sortowaniu” zawartości egzozomów. Ponadto, według najnowszych badań, w transporcie i fuzji błon wewnątrz przedziałów MVB oraz w sekrecji egzozomów uczestniczą także białka z rodziny Rab: Rab11, Rab27a i b oraz Rab35 [10]. Uwolnienie egzozomów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (egzocitoza) następuje w wyniku fuzji błony komórkowej i MVB, co następuje z udziałem transbłonowego kompleksu białkowego SNARE (soluble N – ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) (ryc. 1) [10,50].

Błona egzozomów pod względem budowy i składu biochemicznego nie jest identyczna z błoną komórki rodziciel-



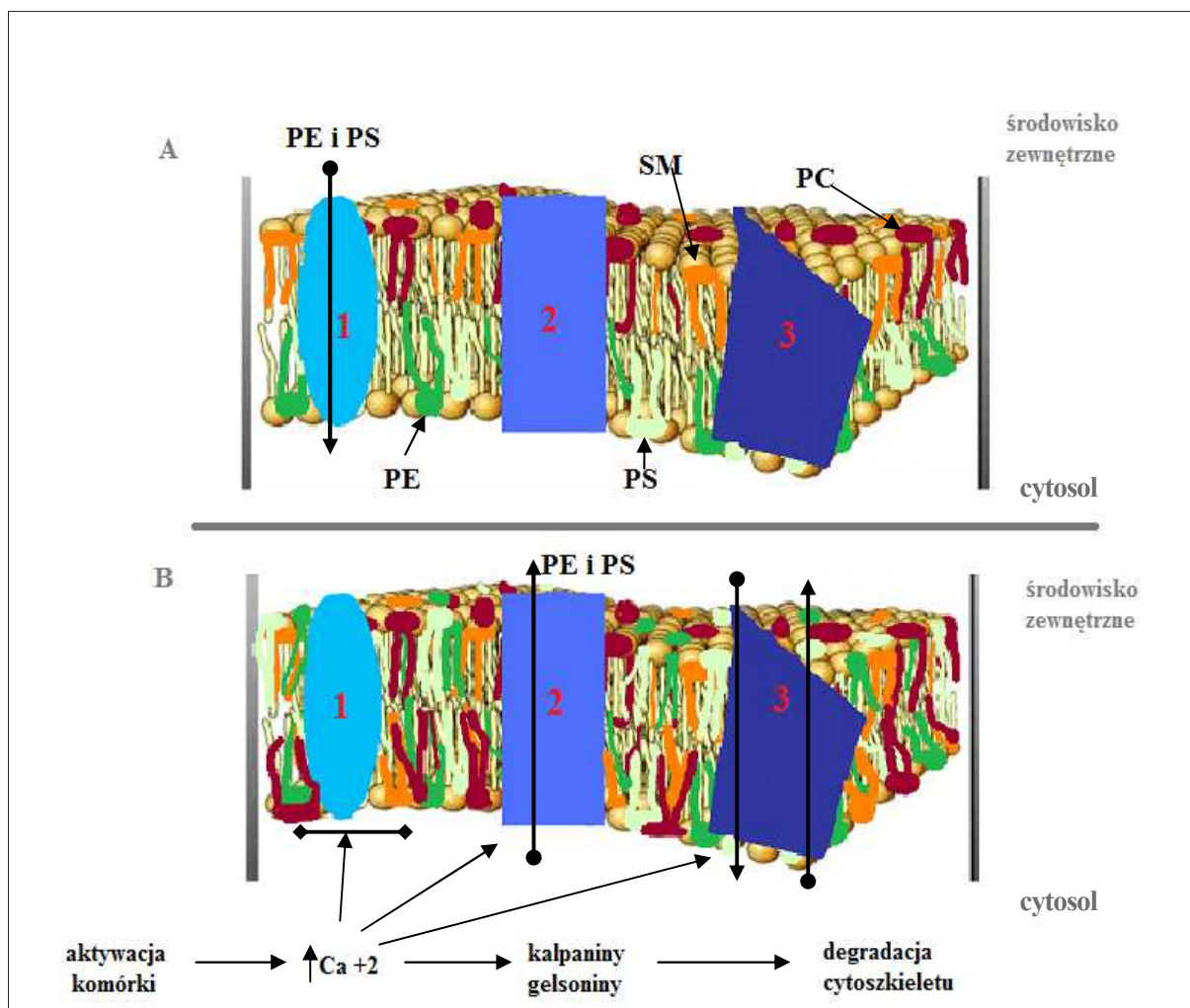
Ryc. 1. Mechanizm powstawania egzosomów (wg [10,12] zmodyfikowano), A – endosom; B – ciało wielopęcherzykowe (MVB); C – egzosom; ESCRT – białkowy kompleks sortujący wymagany do transportu endosomów; Rab11, Rab35, Rab 27a/b – białka z rodziny Rab, które prawdopodobnie wpływają na konkretny rodzaj sekrecji pęcherzyków; SNARE – transbłonowy kompleks białkowy, który uczestniczy w fuzji błon: komórkowej i MVB, po czym następuje uwolnienie ładunku egzosomów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej

skiej. Podczas tworzenia egzosomów, ulega przebudowie, a dokładniej fosfotydyloseryna (PS) zostaje przeniesiona do zewnętrznej części warstwy lipidowej. Uwidacznia się to szczególnie w miejscach, gdzie dochodzi do fuzji błon. Topologia białek błonowych pozostaje nienaruszona, przy czym należy zaznaczyć, że nie wszystkie białka błonowe są obecne w egzosomach [12,32].

Większe EV – MV/ektosomy powstają bezpośrednio w wyniku „pączkowania” (budding) błony komórkowej. Jednak zanim do tego dojdzie, zachodzi wiele zmian i procesów umożliwiających uwolnienie mikrofragmentów na zewnątrz komórki. W stanie równowagi w warstwie lipidowej błony komórkowej znajdują się asymetrycznie ułożone fosfolipidy: PS i fosfatydyloetanolamina (PE) po wewnętrznej części błony, natomiast fosfatydylocholina (PC) i sfingomielina (SM) są obecne w zewnętrznej warstwie. Kontrolę nad tym charakterystycznym rozmieszczeniem sprawuje kompleks składający się z trzech enzymów: flipazy (flippase), flopazy (floppase) i skramblazy (scramblase). Flipaza odpowiada za przenoszenie PE i PS

z zewnętrznej do wewnętrznej warstwy błony komórkowej. Ze względu na amfipatyczny charakter przenoszonych fosfolipidów, jest to proces wymagający sporego nakładu energii dostarczanej z procesu hydrolizy ATP. Flopaza natomiast wykazuje działanie przeciwstawne, czyli odpowiada za transport z wewnętrznej warstwy do zewnętrznej części dwuwarstwy lipidowej. Trzeci enzym – skramblaza, którego funkcją jest transport lipidów w obrębie dwuwarstwy lipidowej, w stanie równowagi komórki, podobnie jak flopaza, pozostaje nieaktywny (ryc. 2A) [12].

Powstawanie MV zależy od jonów wapnia II (Ca^{2+}). Uwolnione przez retikulum endoplazmatyczne jony Ca^{2+} inaktywują działanie flipazy, aktywują zaś flopazę i skramblazę, powodując tym samym zaburzenia w transporcie fosfolipidów, co prowadzi do reorganizacji ich ułożenia w błonie. Wynikiem tych zmian jest zerwanie wiązań między włóknkami cytoszkieletu a fosfolipidami. Ponadto uwolnione Ca^{2+} aktywują kolejne grupy enzymów: kalpaniny oraz gelsoniny, które mają zdolność do wią-



Ryc. 2. Schemat procesu powstawania ekzosomów (wg [10,12] zmodyfikowano), A – błona komórkowa w stanie równowagi; 1, 2, 3 – kompleks enzymów odpowiedzialny za rozmieszczenie fosfolipidów w dwuwarstwie lipidowej: 1 – flipaza (aktywna), 2 – flopaza i 3 – skramblaza (nieaktywne); PE – fosfatydyloetanolamina, PC – fosfatydylocholina, PS – fosfatydyloseryna, SM – sfingomielina; B – zmiany zachodzące w błonie komórkowej podczas powstawania ekzosomów: 1 – nieaktywna, 2 i 3 – aktywne

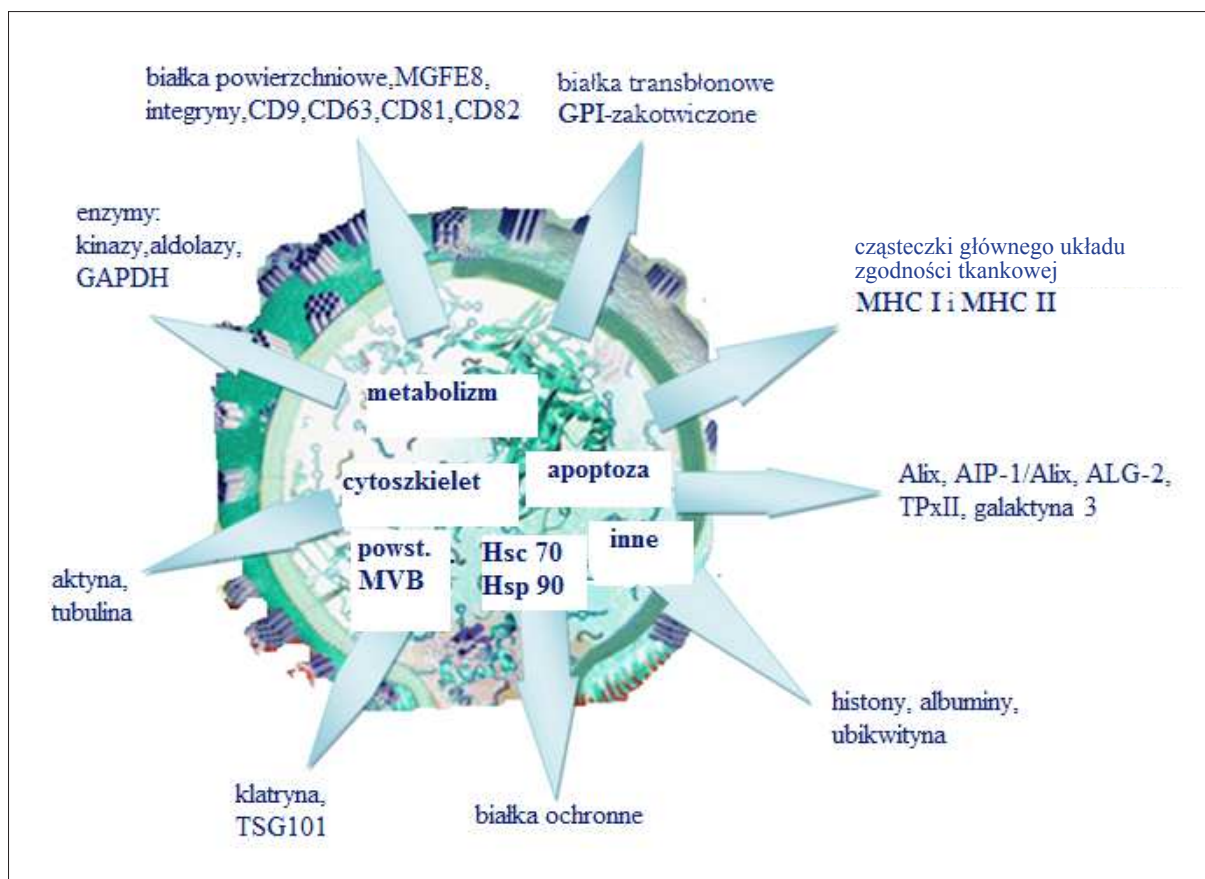
zania i częściowej degradacji filamentów aktynowych. Włókienka białkowe tworzące cytoszkielet zostają więc w znacznym stopniu osłabione, co umożliwia bezpośrednie zainicjowanie procesu wydzielania ekzosomów na zewnątrz komórki (ryc. 2 B) [12,31].

Budowa EV

Badania ostatniej dekady oraz rozwój współczesnej proteomiki pozwoliły na zidentyfikowanie profilu białkowego EV. MV są opisywane głównie na podstawie obecności białek charakterystycznych dla komórki rodzicielskiej [34]. Natomiast dla ekzosomów udało się zidentyfikować typowe markery białkowe (ryc. 3). Do „podstawowego” zestawu białek większości ekzosomów zalicza się m.in. białka przezbłonowe należące do rodziny tetraspanin (tetraspanin family): CD9, CD63, CD81 i CD82, grupę białek zaangażowanych w proces apoptozy: AIP-1/Alix, ALG-2, TPxII oraz antyapoptyczną galaktynę 3 [33,56,58], po-

wierzchniowe białko wiążące lipidy MFGE8 (milk fat globule EGF/factor VIII), cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej MHC (major histocompatibility complex) klasy I i II, integryny, powierzchniowe peptydazy (CD13, CD26), białka GPI-zakotwiczone (GPI-anchored): CD55 i CD59 [14] oraz białko TSG101 uczestniczące w biogenezie MVB [56,57]. W ekzosomach zidentyfikowano również inne białka, takie jak np. klatrynę, aneksyny, kompleks Rab-GTP, białka cytoszkieletu (aktyna, tubulina), białka szoku cieplnego HSP (heat shock proteins), enzymy: dehydrogenazę gliceroaldehydofosforanową – GAPDH, enolazy, kinazę fosfoglicerynianową i aldolazy oraz czynnik inicjujący translację – eIF4 i czynnik elongacyjny – eEF1 [15].

Względnie częste występowanie wymienionych białek oraz to, że ich obecność koreluje z pełnioną przez nie funkcją (białka cytoszkieletu, enzymy, białka zaangażowane bezpośrednio w proces uwalniania ekzosomów czy białka ochronne) dowodzą, że mechanizm powstawania



Ryc. 3. Podstawowy profil białkowy egzosomów (wg [15,55,56] zmodyfikowano)

egzosomów jest procesem swoistym i dokładnie zaplanowanym, a same egzosomy nie są jedynie sferycznymi fragmentami błony komórkowej, ale prawdziwymi subkomórkowymi kompartmentami [57].

MV mają bardziej niejednorodny skład białkowy, ściśle zależny od rodzaju komórki, z której pochodzą. Na ich powierzchni zidentyfikowano wiele specyficznych markerów np. antygen CD235a występujący na MV pochodzenia erytrocytarnego [12], CD11c obecny na MV uwalnianych z komórek dendrytycznych (DC – dendritic cells) czy CD41 na MV uwalnianych z płytek krwi. Markery te sugerują określone właściwości MV i pełnione przez nie funkcje w organizmie oraz pozwalają określić ich potencjalne wykorzystanie w medycynie czy biotechnologii [12,40].

Oprócz białek, ektosomy zawierają również liczne fosfolipidy, które są ważnym elementem składowym ich błony. Na podstawie dotychczasowych badań nie można określić stałego, charakterystycznego dla mikrofragmentów błonowych profilu lipidowego. Zwraca się jednak uwagę na podobieństwa w składzie lipidowym błony komórki rodzicielskiej i EV, z uwzględnieniem szczególnej roli tratw lipidowych (lipid rafts) w tych ostatnich [32]. Na przykład opisano podobieństwo składu lipidowego błony erytrocytów i pochodzących z nich mikrofragmentów błonowych [63]. Jednak ektosomy uwalniane przez limfocyty B, ko-

mórki dendrytyczne, komórki tuczne i linie komórkowe czerniaka są wzbogacone w sfingomielinę a nie cholesterol w porównaniu do komórek, z których pochodzą [66].

Opublikowane w 2006 i 2007 r. wyniki badań wskazywały na obecność informacji genetycznej w postaci mRNA i mikroRNA zawartej w MV uwalnianych przez komórki linii raka trzustki oraz linie komórek tucznych [10,59]. Zweryfikowanie tego odkrycia nastąpiło nieznacznie później, kiedy wyizolowano mRNA i mikroRNA z egzosomów oczyszczonych z komórek ludzkiego glejaka, a obecność kwasów rybonukleinowych potwierdzono za pomocą analizy z użyciem mikromacierzy [52].

Funkcja i znaczenie EV

Skład EV odzwierciedla w dużej mierze pochodzenie komórkowe i określa zakres informacji przenoszonych przez EV. Małe rozmiary EV umożliwiają ich „przemieszczanie się” na znaczne odległości wraz z płynami ustrojowymi, a zdolność do wiązania się z komórkami docelowymi umożliwia szeroki zakres działania. Ten rodzaj komunikacji międzykomórkowej odgrywa zasadniczą rolę w modulacji mikrośrodowiska, gdyż w pęcherzykach transportowany jest cały „pakiet” informacji, który oprócz białek regulatorowych i receptorów zawiera również RNA i lipidy [32,50].

Do tej pory poznano kilka mechanizmów wymiany informacji za pośrednictwem EV:

- bezpośrednia stymulacja komórki docelowej poprzez ligandy dostarczone przez EV (pobudzenie do wydzielania czynników wzrostu, cytokin, bioaktywnych lipidów) [8,30,67];
- transfer receptorów powierzchniowych z jednej komórki do drugiej (cząsteczki adhezyjne, receptory błonowe) [7,45];
- epigenetyczne reprogramowanie komórki docelowej przez dostarczenie białek, mRNA i/lub czynników transkrypcyjnych [13];

EV mogą służyć również jako wektor dla cząstek zakaźnych, takich jak HIV czy priony [35,44,45].

Komórka docelowa otrzymuje więcej informacji, w wyniku czego może dojść nawet do zmiany jej pierwotnego charakteru (transformacji). Tak zmieniona komórka może wydzielać dalej do mikrośrodowiska EV zawierające „zakutalizowane” informacje [43].

Dotychczas dużą część badań nad EV przeprowadzono na MV pochodzenia płytkowego (PMV – platelet-derived microvesicles). Pozwoliły one stwierdzić, że PMV wpływają na proces krzepnięcia i mogą zwiększać ryzyko tworzenia zakrzepów naczyniowych [62]. W niektórych schorzeniach charakteryzujących się zaburzeniami krzepnięcia krwi (np. zespół Scotta, defekt Castamana) stwierdzono wrodzony defekt tworzenia PMV [68]. Poza niewątpliwą funkcją pełnioną w procesie krzepnięcia, PMV odgrywają także ważną rolę w innych procesach biologicznych, np. mogą stymulować wydzielanie cytokin i czynnika tkankowego w komórkach śródbłonki lub hamować apoptozę leukocytów [31]. Sugeruje się również, że obecne w dużych stężeniach PMV w rejonach objętych stanem zapalnym modulują chemotaksję komórek układu odpornościowego: monocytów, komórek NK (natural killer), limfocytów B i T [22]. Ponadto PMV wykazują ekspresję integryny CD41 i P-selektyny (CD62P), które biorą udział w aktywacji granulocytów obojętnochłonnych i tworzeniu oddziaływań między nimi a komórkami śródbłonki oraz między samymi neutrofilami, co ma znaczenie w różnego typu reakcjach zapalnych [26]. Obecne na powierzchni PMV bioaktywne lipidy, w tym 1-fosforan sfingozyny (S1P) i cząsteczki kwasu arachidonowego (AA) działają proangiogenicznie [27].

Druga duża grupa badań dotyczy egzosomów, które uwalniane przez DC mogą bezpośrednio stymulować limfocyty T CD8⁺ dzięki obecności cząsteczek MHC klasy I [1]. Ponadto stwierdzono, iż egzosomy pochodzące z dojrzałych DC lepiej aktywują limfocyty T niż egzosomy z niedojrzałych DC, co może potwierdzać ich rolę w kostymulacji limfocytów T [1]. EV indukując wydzielanie różnych białek mogą również (w sposób pośredni) podnosić efektywność odpowiedzi immunologicznej [8]. Wiele badań wskazuje jednak, że MV oprócz stymulacji układu odpornościowego mogą powodować także hamowanie reakcji odpornościowych. Odnosi się to zwłaszcza do MV pochodzenia nowotworowego (TMV, patrz dalej).

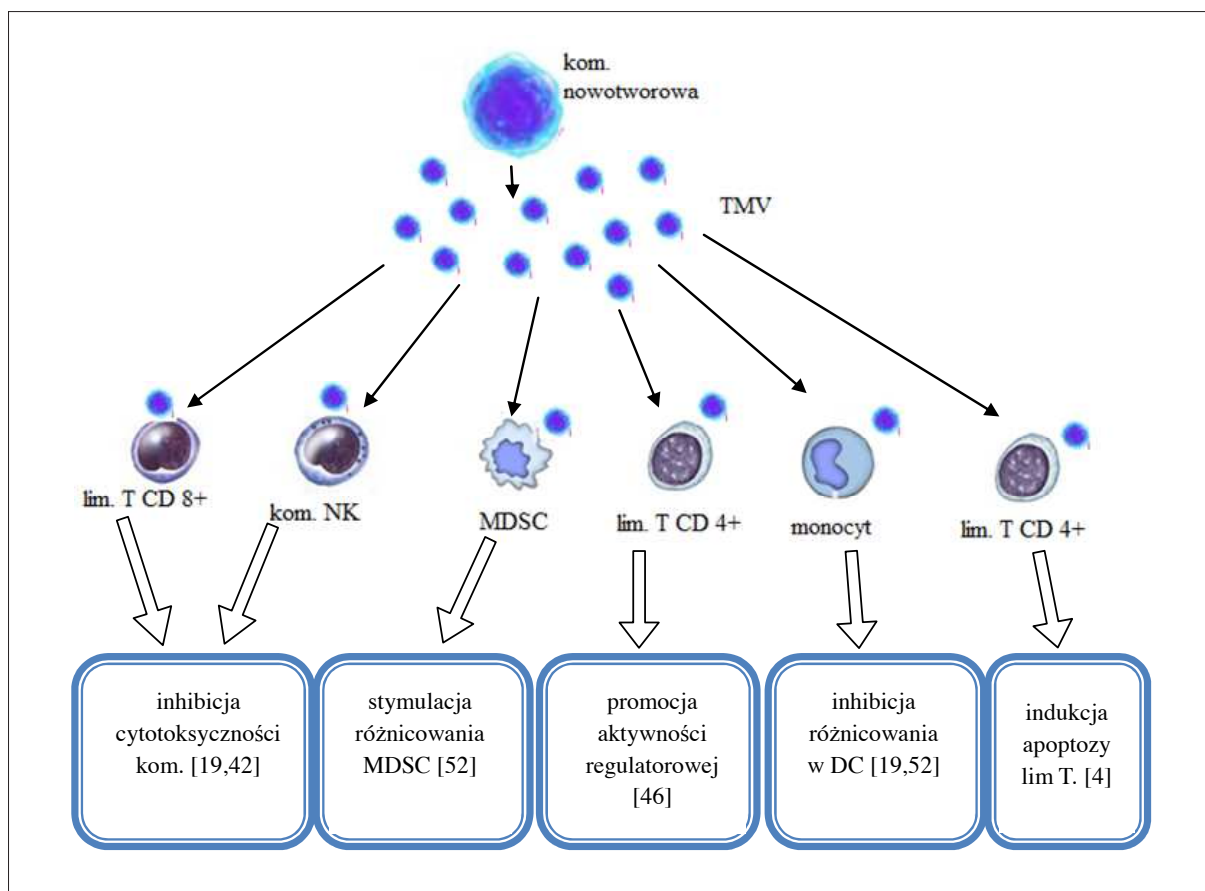
ROLA TMV W CHOROBIE NOWOTWOROWEJ

Od czasów ukazania się pierwszej publikacji dotyczącej wydzielania EV przez komórki czerniaka [41] do chwili obecnej, opublikowano wyniki wielu badań potwierdzających zdolność komórek nowotworowych do uwalniania TMV, zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. Wraz z rozwojem metod badawczych wzrosła możliwość wykrywania TMV w krwi, moczu czy innych płynach ustrojowych. W 2009 r. Nilsson i wsp. zidentyfikowali na powierzchni MV wyizolowanych z moczu od pacjentów chorych na raka gruczołu krokowego typowe dla tego rodzaju nowotworu markery: PSA (prostate specific antigen) i PCA3 (prostate cancer gene 3) [38]. Dalsze analizy wykazały, że TMV mogą bezpośrednio uczestniczyć w wielu etapach rozwoju choroby nowotworowej, między innymi w procesie angiogenezy, co ma istotne znaczenie w przerzutowaniu nowotworu.

Mechanizm działania TMV można określić jako parakrynnny, ponieważ przenoszą/dostarczają „ładunek informacyjny”, różny w zależności od rodzaju komórki nowotworowej, do odległych komórek. Wykazano także występowanie dodatniej korelacji między liczbą TMV we krwi chorych, a stopniem zaawansowania choroby, co może dodatkowo potwierdzać znaczenie TMV w progresji nowotworu [9,64].

Wpływ TMV na układ immunologiczny

Rozwój nowotworu jest złożonym procesem, w którym układ immunologiczny zaczyna odgrywać rolę stosunkowo późno, w chwili pojawienia się pierwszych komórek nowotworowych. Jest to etap już po wystąpieniu i utrwaleniu zmian w materiale genetycznym komórki, jednak nie na tyle późno, by nie móc zahamować lub spowolnić rozwój choroby. Jedną z podstawowych funkcji, którą przypisuje się TMV jest właśnie supresja odpowiedzi immunologicznej w reakcji na rozwijający się nowotwór [25]. Istnieje kilka teorii wyjaśniających rolę TMV w ucieczce guza spod nadzoru immunologicznego (ryc. 4). W miarę zaawansowania choroby nowotworowej zwiększa się liczba wydzielanych TMV, przez co komórki nowotworowe tracą większość swoich antygenów i przestają być rozpoznawane przez limfocyty Tc i komórki NK pacjenta [18]. Wyniki innych badań przedstawiają zdolność TMV pochodzących z komórki czerniaka i komórki raka jelita grubego do indukowania różnicowania monocytów do supresorowych MDSC (myeloid derived suppressor cells) [60]. Stwierdzono również, że monocyty po inkubacji z TMV wydzielają transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β – transforming growth factor β), który hamował proliferację limfocytów T [60]. Ponadto wykazano, że TMV mające ekspresję cząsteczek FasL, TRAIL lub galektyny 9, w warunkach *in vitro* są w stanie indukować apoptozę efektorowych limfocytów T [5]. TMV mogą również zmniejszać wydzielanie interleukiny 2 (IL-2), niezbędnej do proliferacji limfocytów T, a także mogą promować powstawanie limfocytów T regulacyjnych (Treg) i/lub mieloidalnych komórek supresyjnych.



Ryc. 4. Hamujący wpływ TMV na układ immunologiczny (wg [47] zmodyfikowano), NKGD2 – receptor powierzchniowy aktywujący komórki NK; MDSC – meloidalne komórki supresorowe; (myeloid-derived suppressor cell); TIM3 białko powierzchniowe regulujące aktywność limfocytów T pomocniczych – Th (T cell immunoglobulin and mucin protein-3); CD95 – receptor FAS

rowych, hamujących reakcje odpornościowe [25,54,55]. Dodatkowo niektórzy badacze sugerują, że wzmożone wydzielanie TMV przez komórki nowotworowe może powodować utratę przez nie kaspazy 3 – enzymu „wykonawczego” apoptozy, co przypuszczalnie prowadzi do obniżonej wrażliwości komórek nowotworowych na indukcję tego rodzaju śmierci komórki [11]. Dane literaturowe wskazują, że TMV mogą wywierać wieloraki wpływ na układ immunologiczny, ale ostateczny wynik ich działania jest wypadkową wielu czynników, m.in. rodzaju nowotworu i/lub jego stadium zaawansowania oraz rodzaju komórek układu immunologicznego, do których docierają TMV [25,55].

Funkcja TMV w progresji nowotworu

TMV mogą nie tylko ułatwiać ucieczkę nowotworu spod nadzoru immunologicznego, ale również promować jego rozwój przez sygnalizację auto – i/lub parakrynną, modulując tym samym mikrośrodowisko guza i ułatwiając nabycie przez prawidłowe komórki agresywnego fenotypu [2]. Dzięki możliwości poziomego transferu cząsteczek, w tym mRNA i mikroRNA, TMV mogą modyfikować fenotyp i genotyp prawidłowych komórek docelowych. Wykazano, że TMV wyizolowane z krwi

pacjentów z glejakiem wielopostaciowym przenoszą onkogeny np. EGFRvIII [2,52]. Wyniki badań prowadzonych na TMV wyizolowanych z płynów ustrojowych chorych na raka piersi i raka płuc dowiodły, że wzmacniają one ekspresję mRNA dla czynników angiogennych, takich jak: naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF – vascular endothelial growth factor), IL-8, czynnik wzrostu hepatocytów (HGF – hepatocyte growth factor) oraz zwiększają adhezję komórek raka płuc do śródbłonka, powodując tym samym zwiększenie powstawania przerzutów *in vivo* [30]. Zdolność do inwazji komórek nowotworowych jest w dużej mierze zależna od ich zdolności do degradacji białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM – extracellular matrix), migracji wraz z krwiobiegiem i/lub limfą, obecnością białek adhezyjnych umożliwiających „zasiedlenie” nowych nisz oraz powstawania naczyń krwionośnych odżywiających nowo powstające ognisko guza. W licznych badaniach zidentyfikowano na powierzchni TMV pochodzących z różnych typów nowotworów obecność białek adhezyjnych, proteaz, białek macierzy zewnątrzkomórkowej i stymulatorów angiogenezy. Stwierdzono, że niektóre TMV zawierają kilka rodzajów metaloproteinaz: MMP2, MMP9, MT1-MMP i ich nieaktywne postaci – zymogeny oraz urokinazowy aktywator plazminogenu (uPA), a także induktor meta-

loproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (EMMPRIN – extracellular matrix metalloprotease inducer) [7,23,28]. MMP są odpowiedzialne za degradację kolagenu, natomiast uPA ułatwia aktywację zymogenów MMP w postaci aktywne przez konwersję plazminogenu do aktywnej plazminy oraz bierze udział w degradacji fibryny, która jest składową ECM. TMV mogą dodatkowo zawierać również inny czynnik rozkładający ECM – katepsynę β , która uaktywnia się przy niskim pH (charakterystycznym zwłaszcza dla guzów litych), a spowodowanym wzmożonym procesem glikolizy przeprowadzanym przez komórki nowotworowe [29]. TMV wyizolowane z hodowli mysich i ludzkich komórek nowotworowych wykazywały ekspresję cząsteczek adhezji międzykomórkowej typu 1 (ICAM-1 – intercellular adhesion molecule-1) i cząsteczek adhezji śródbłonka (VCAM – vascular adhesion molecule), które umożliwiają adhezję komórek [66]. ICAM-1 i VCAM mogą również wspomagać angiogenezę niezbędną do rozwoju guza przez stymulację fibroblastów zrębu do wydzielania czynników proangiogennych. Ponadto niektóre TMV wpływają bezpośrednio na proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych dzięki obecności śródbłonkowego czynnika wzrostu i jego receptora (VEGF/VEGFR – vascular endothelial growth factor/receptor) [7] oraz lipidów proangiogennych, takich jak S1P [22]. Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika zatem, że TMV odgrywają ważną rolę w progresji nowotworu, z jednej strony wzmacniając „złośliwy” fenotyp komórek nowotworowych przez poziomy transfer cząstek efektorowych, z drugiej zaś, mając zdolność migracji na znaczne odległości, modulują „zasiedlane” mikrośrodowisko stwarzając optymalne warunki do rozwoju nowego ogniska guza.

Wpływ TMV na dystrybucję leków w organizmie

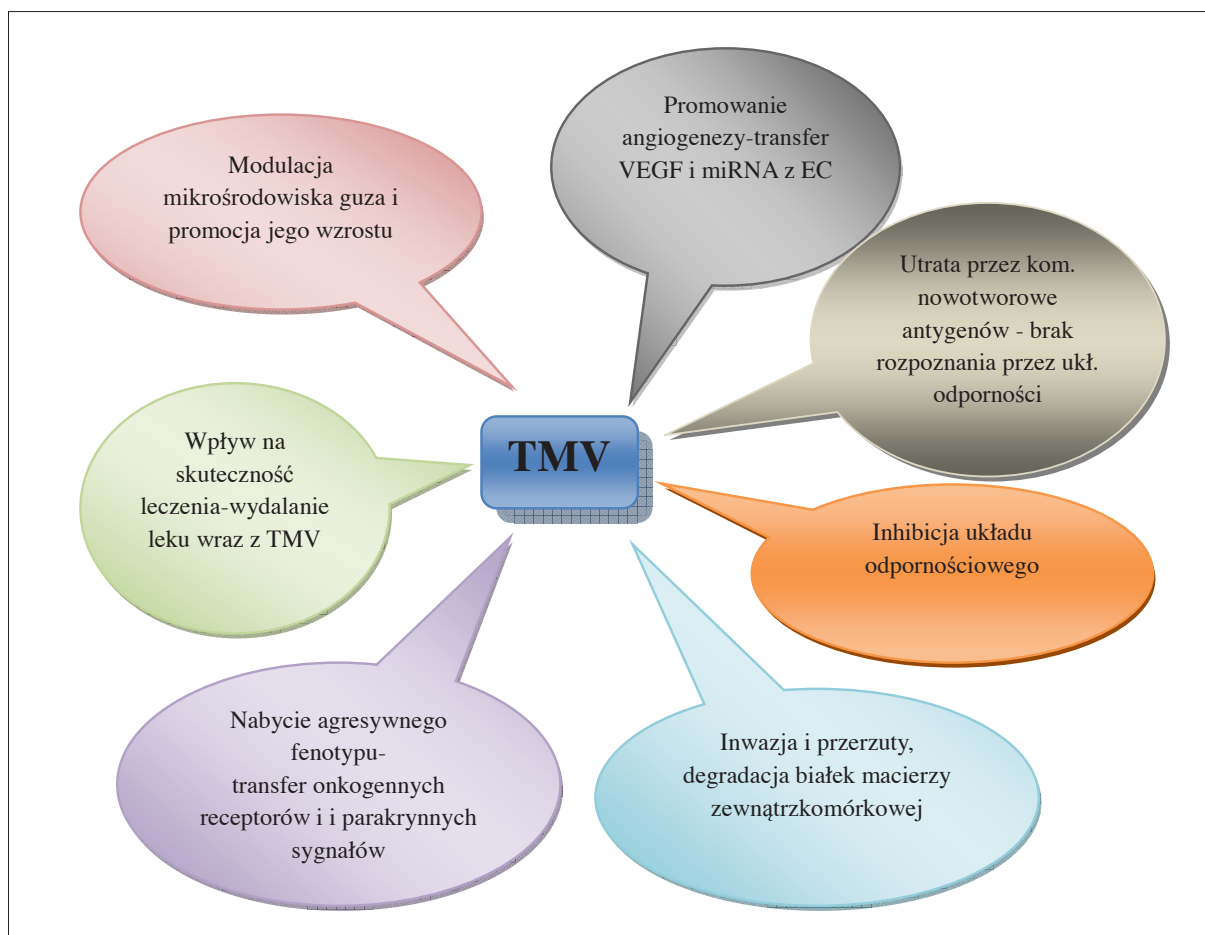
TMV, oprócz supresji odpowiedzi układu immunologicznego na rozwijający się nowotwór, prawdopodobnie zwiększają także oporność komórek nowotworowych na stosowane leki. Przyczyną zmniejszonej skuteczności terapii lekowej stwierdzanej u niektórych pacjentów jest oporność wielolekowa (MDR – multi drug resistance), która charakteryzuje się zdolnością do usuwania z komórki różnych chemioterapeutyków przez specjalistyczne pompy błonowe, np. glikoproteinę P. Przypuszcza się, że TMV mogą przekazywać glikoproteinę P komórkom nowotworowym, które jej wcześniej nie miały i uniewrażliwiać kolejne komórki nowotworowe na działanie leków [3,25]. Inną strategią tłumaczącą rolę TMV w lekooporności komórek nowotworowych może być eliminacja leku z komórki nowotworowej wraz z uwalnianymi TMV, co zostało opisane w przypadku eliminacji doksorubicyny z komórek raka jajnika [47]. Również wyniki badań z użyciem cisplatyny (CDD – cis-diamminedichloroplatinum) wskazujące na 2,6-krotnie większe stężenie CDDP w TMV uwalnianych z komórek raka jajnika opornych na działanie leku w porównaniu do TMV pochodzących z komórek wrażliwych na CDDP [46], zdają się przemawiać za słusznością tej hipotezy.

Potencjalne możliwości wykorzystania EV

Od czasu stwierdzenia obecności EV krążących we krwi, pojawiły się liczne teorie dotyczące roli EV jako nośników informacji biologicznej. Wykazano, że EV występujące w osoczu krwi mogą pochodzić z różnych elementów morfotycznych krwi, takich jak płytki krwi, erytrocyty i leukocyty, ale także z komórek sąsiednich, np. śródbłonka naczyń. Mimo że EV stanowią niewielki odsetek całkowitego składu białkowego osocza to zawierają dość zróżnicowany profil białkowy, który jest ściśle zależny od komórki, z której pochodzą [53]. Można to wykorzystać do wczesnej identyfikacji stanu chorobowego, a nawet do oceny stadium zaawansowania choroby [9,15,53,64]. Dodatkowym atutem przemawiającym za wykorzystaniem EV w diagnostyce klinicznej jest także możliwość ich izolacji z płynów ustrojowych. Oprócz krwi, obecność EV potwierdzono między innymi w moczu, który może być jednym z najbardziej obiecujących źródeł tych biomarkerów [34].

Duże nadzieje pokłada się w wykorzystaniu EV w immunoterapii różnych schorzeń. Wiąże się to z właściwościami EV pochodzących z komórek układu odpornościowego. Wiadomo, że EV są w stanie uniknąć lizy zależnej od aktywacji układu dopełniacza [17] oraz są odporne na RNAazy, co chroni transportowane przez nie mRNA i microRNA przed degradacją [58]. Liczne badania, w tym także badania fazy przedklinicznej, wykazały zdolność EV do stymulacji układu immunologicznego [16,19,55], co może być w przyszłości wykorzystane do produkcji szczepionek. W fazie badań klinicznych znajdują się prace nad stworzeniem szczepionki zawierającej egzozomy pochodzące z DC (Dex – dendritic cell derived-exosomes) mające między innymi zdolność aktywacji limfocytów T CD4⁺ i T CD8⁺ [24,55]. Dex zostały przetestowane pod względem bezpieczeństwa i skuteczności w badaniach klinicznych z udziałem pacjentów w zaawansowanym stadium czerniaka i drobnokomórkowego raka płuc. Wyniki prób klinicznych wskazują, iż Dex mogą skutecznie indukować swoistą odpowiedź limfocytów T [24,36,55]. Ponadto trwają również zaawansowane badania nad wykorzystaniem egzozomów pochodzenia nowotworowego (Tex – tumour cell derived-exosomes) oraz egzozomów z płynu wysiękowego jamy opłucnej lub otrzewnej pacjentów z chorobą nowotworową (Aex – ascites derived-exosomes) [55]. Wykazano, że szczepionka zawierająca Aex i czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów i granulocytów (GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) może wywołać silną odpowiedź przeciwnowotworową przez stymulację limfocytów Tc u pacjentów w zaawansowanym stadium raka jelita grubego (CRC – colorectal cancer) co sugeruje, że użycie Aex + GM-CSF może być skuteczną alternatywą stosowaną w immunoterapii zaawansowanego CRC [20].

Aktywacja limfocytów T i możliwość aktywacji komórek żernych układu odpornościowego mogą być wykorzystane także do produkcji szczepionek przeciwko niektórym drobnoustrojom chorobotwórczym, np. *Mycobacterium*



Ryc. 5. Rola TMV w transformacji nowotworowej (wg [37] zmodyfikowano)

tuberculosis czy wiciowców z rodzaju *Leishmania* (*L. major*, *L. donovani*). W takim przypadku przypuszcza się, że MV uwolnione z zakażonych makrofagów będą aktywować mechanizmy prowadzące do eliminacji patogenów [49,51].

PODSUMOWANIE

Ze względu na właściwości EV, w tym TMV uważa się, że mogą one odgrywać istotną rolę w progresji choroby nowotworowej (ryc. 5). Prowadzone badania mają na celu przede wszystkim weryfikację obecności na powierzchni MV niektórych antygenów, zwłaszcza tych pochodzenia nowotworowego. Jednym z takich nowatorskich podejść może być wykrywanie w płynach ustrojowych antygenów nowotworowych przenoszonych przez TMV i ich potencjalne wykorzystanie w diagnostyce onkologicznej jako wczesnego markera choroby oraz celowanej terapii przeciwnowotworowej [33,39,55]. Dotychczasowe badania dostarczyły licznych argumentów potwierdzających obecność markerów nowotworowych przenoszonych przez TMV zarówno *in vivo* (TMV izolowane najczęściej

z osocza pacjentów), jak i *in vitro* (TMV pochodzące z medium hodowlanego nowotworowych linii komórkowych). Zidentyfikowanie markerów nowotworowych na TMV jest celem nowych i/lub alternatywnych strategii leczenia chorób nowotworowych. Jednym z potencjalnych sposobów wykorzystania właściwości TMV może być stymulacja układu odpornościowego do zwalczania komórek nowotworowych przez szczepionki zawierające neoantygeny pochodzące z TMV [55]. U podstaw tej koncepcji leżą badania potwierdzające możliwość wykorzystania TMV do transportu antygenów nowotworowych do komórek prezentujących antygen, głównie DC, co inicjuje i/lub wzmacnia swoistą odpowiedź przeciwnowotworową [14]. Zmniejszenie jednak liczby uwalnianych TMV mogłoby spowolnić wzrost guza oraz, według niektórych badaczy [18], zwiększyć „widoczność” komórek nowotworowych, które nie traciłyby wraz z TMV markerów, istotnych dla układu odpornościowego. Obiecujące wyniki badań dotyczących właściwości MV i/lub TMV przemawiają za możliwością ich wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej [55], a same EV wydają się przyszłościowym markerem w diagnostyce klinicznej [42].

PIŚMIENICTWO

- [1] Admyre C., Johansson S.M., Paulie S., Gabrielsson S.: Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *Eur. J. Immunol.*, 2006; 36: 1772-1781
- [2] Al-Nedawi K., Meehan B., Micallef J., Lhotak V., May L., Guha A., Rak J.: Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFR-vIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell Biol.*, 2008; 10: 619-624
- [3] Ambudkar S.V., Sauna Z.E., Gottesman M.M., Szakacs G.: A novel way to spread drug resistance in tumor cells: functional intercellular transfer of P-glycoprotein (ABC1). *Trends Pharmacol. Sci.*, 2005; 26: 385-387
- [4] Andre F., Scharzt N.E., Movassagh M., Flament C., Pautier P., Morice P., Pomel C., Lhomme C., Escudier B., Le Chevalier T., Tursz T., Amigorena S., Raposo G., Angevin E., Zitvogel L.: Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*, 2002; 360: 295-305
- [5] Andreola G., Rivoltini L., Castelli C., Huber V., Perego P., Deho P., Squarcina P., Accornero P., Lozupone F., Lugini L., Stringaro A., Molinari A., Arancia G., Gentile M., Parmiani G., Fais S.: Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J. Exp. Med.*, 2002; 195: 1303-1316
- [6] Arteaga R.B., Chirinos J.A., Soriano A.O., Jy W., Horstman L., Jimenez J.J., Mendez A., Ferreira A., de Marchena E., Ahn Y.S.: Endothelial microparticles and platelet and leukocyte activation in patients with the metabolic syndrome. *Am. J. Cardiol.*, 2006; 98: 70-74
- [7] Baj-Krzyworzeka M., Szatanek R., Weglarczyk K., Baran J., Urbanowicz B., Brański P., Ratajczak M.Z., Zembala M.: Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2006; 55: 808-818
- [8] Baj-Krzyworzeka M., Szatanek R., Węglarczyk K., Baran J., Zembala M.: Tumour-derived microvesicles modulate biological activity of human monocytes. *Immunol. Lett.*, 2007; 113: 76-82
- [9] Baran J., Baj-Krzyworzeka M., Weglarczyk K., Szatanek R., Zembala M., Barbasz J., Czupryna A., Szczepanik A., Zembala M.: Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2010; 59: 841-850
- [10] Bobrie A., Colombo M., Raposo G., Théry C.: Exosome secretion: molecular mechanism and roles in immune responses. *Traffic*, 2011; 12: 1659-1668
- [11] Böing A.N., Hau C.M., Sturk A., Nieuwland R.: Platelet microparticles contain active caspase 3. *Platelets*, 2008; 19: 96-103
- [12] Burnier L., Fontana P., Kwak B.R., Angelillo-Scherrer A.: Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Tromb. Haemost.*, 2009; 101: 439-451
- [13] Camussi G., Deregibus M.C., Bruno S., Grange C., Fonsato V., Tetta C.: Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am. J. Cancer Res.*, 2011; 1: 98-110
- [14] Chaput N., Scharzt N.E., André F., Taieb J., Novault S., Bonnaventure P., Aubert N., Bernard J., Lemonnier F., Merad M., Adema G., Adams M., Ferrantini M., Carpentier A.F., Escudier B., Tursz T., Angevin E., Zitvogel L.: Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection. *J. Immunol.*, 2004; 172: 2137-2146
- [15] Chaput N., Théry C.: Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin. Immunopathol.*, 2011; 33: 419-440
- [16] Cho J.A., Lee Y.S., Kim S.H., Ko J.K., Kim C.W.: MHC independent anti-tumor immune responses induced by Hsp70-enriched exosomes generate tumor regression in murine models. *Cancer Lett.*, 2009; 275: 256-265
- [17] Clayton A., Harris C.L., Court J., Mason M.D., Morgan B.P.: Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. *Eur. J. Immunol.*, 2003; 33: 522-531
- [18] Cocucci E., Racchetti G., Meldolesi J.: Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.*, 2009; 19: 43-51
- [19] Colino J., Snapper C.M.: Exosomes from bone marrow dendritic cells pulsed with diphtheria toxoid preferentially induce type 1 antigen-specific IgG responses in naive recipients in the absence of free antigen. *J. Immunol.*, 2006; 177: 3757-3762
- [20] Dai S., Wei D., Wu Z., Zhou X., Wei X., Huang H., Li G.: Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol. Ther.*, 2008; 16: 782-790
- [21] Diamant M., Tushuizen M.E., Sturk A., Nieuwland R.: Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur. J. Clin. Invest.*, 2004; 34: 392-401
- [22] Distler J.H., Pisetsky D.S., Huber L.C., Kalden J.R., Gay S., Distler O.: Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.*, 2005; 52: 3337-3348
- [23] Dolo V., D'Ascenzo S., Violini S., Pompucci L., Festuccia C., Ginestra A., Vittorelli M.L., Canevari S., Pavan A.: Matrix-degrading proteinases are shed in membrane vesicles by ovarian cancer cells *in vivo* and *in vitro*. *Clin. Exp. Metastasis*, 1999; 17: 131-140
- [24] Escudier B., Dorval T., Chaput N., André F., Caby M.P., Novault S., Flament C., Leboulleire C., Borg C., Amigorena S., Boccaccio C., Bonnerot C., Dhellin O., Movassagh M., Piperno S. i wsp.: Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J. Transl. Med.*, 2005; 3: 10
- [25] Filipazzi P., Bürdek M., Villa A., Rivoltini L., Huber V.: Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression. *Semin. Cancer Biol.*, 2012; 22: 342-349
- [26] Forlow S.B., McEver R.P., Nollert M.U.: Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood*, 2000; 95: 1317-1323
- [27] Giusti I., D'Ascenzo S., Millimaggi D., Tarabozetti G., Carta G., Franceschini N., Pavan A., Dolo V.: Cathepsin B mediates the pH-dependent proinvasive activity of tumor-shed microvesicles. *Neoplasia*, 2008; 10: 481-488
- [28] Hakulinen J., Sankkila L., Sugiyama N., Lehti K., Keski-Oja J.: Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes. *J. Cell. Biochem.*, 2008; 105: 1211-1218
- [29] Hugel B., Martinez M.C., Kunzelmann C., Freyssinet J.M.: Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology*, 2005; 20: 22-27
- [30] Janowska-Wieczorek A., Wysoczyński M., Kijowski J., Marquez-Curtis L., Machaliński B., Ratajczak J., Ratajczak M.Z.: Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int. J. Cancer*, 2005; 113: 752-760
- [31] Jimenez J.J., Jy W., Mauro L.M., Soderland C., Horstman L.L., Ahn Y.S.: Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb. Res.*, 2003; 109: 175-180
- [32] Kharaziha P., Ceder S., Li Q., Panaretakis T.: Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1826: 103-111

- [33] Kosaka N., Iguchi H., Ochiya T.: Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.*, 2010; 101: 2087-2092
- [34] Mathivanan S., Simpson R.J.: ExoCarta: a compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics*, 2009; 9: 4997-5000
- [35] Meckes D.G. Jr., Raab-Traub N.: Microvesicles and viral infection. *J. Virol.*, 2011; 85: 12844-12854
- [36] Morse M.A., Garst J., Osada T., Khan S., Hobeika A., Clay T.M., Valente N., Shreenivas R., Sutton M.A., Delcayre A., Hsu D.H., Le Pecq J.B., Lysterly H.K.: A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J. Transl. Med.*, 2005; 3: 9
- [37] Muralidharan-Chari V., Clancy J.W., Sedgwick A., D'Souza-Schorey C.: Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J. Cell Sci.*, 2010; 123: 1603-1611
- [38] Nilsson J., Skog J., Nordstrand A., Baranov V., Mincheva-Nilsson L., Breakefield X.O., Widmark A.: Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br. J. Cancer*, 2009; 100: 1603-1607
- [39] Pap E.: The role of microvesicles in malignancies. W: *Cell Fusion in Health and Disease*, Red.: Dittmar T., Zänker K.S.: Adv. Exp. Med., 2011; 950: 183-199
- [40] Peché H., Heslan M., Usal C., Amigorena S., Cuturi M.C.: Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation*, 2003; 76: 1503-1510
- [41] Poutsiaika D.D., Schröder E.W., Taylor D.D.: Membrane vesicles shed by murine melanoma cells selectively inhibit the expression of Ia antigen by macrophages. *J. Immunol.*, 1985; 134: 138-144
- [42] Raimondo F., Morosi L., Chinello C., Magni F., Pitto M.: Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomics*, 2011; 11: 709-720
- [43] Ratajczak J., Wysoczynski M., Hayek F., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak M.Z.: Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*, 2006; 20: 1487-1495
- [44] Robertson C., Booth S.A., Beniac D.R., Coulthart M.B., Booth T.F., McNicol A.: Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets. *Blood*, 2006; 107: 3907-3911
- [45] Rozmyslowicz T., Majka M., Kijowski J., Gaulton G., Ratajczak M.Z.: A new role of platelet – and megakaryocyte-derived microparticles (MP) in HIV infection. *Blood*, 2001; 98: 786a
- [46] Safaei R., Larson B.J., Cheng T.C., Gibson M.A., Otani S., Naerdemann W., Howell S.B.: Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.*, 2005; 4: 1595-604
- [47] Shedden K., Xie X.T., Chandaroy P., Chang Y.T., Rosania G.R.: Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res.*, 2003; 63: 4331-4337
- [48] Shen B., Wu N., Yang J.M., Gould S.J.: Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 14383-14395
- [49] Silverman J.M., Clos J., Horakova E., Wang A.Y., Wiesgigl M., Kelly I., Lynn M.A., McMaster W.R., Foster L.J., Levings M.K., Reiner N.E.: *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.*, 2010; 185: 5011-5022
- [50] Simons M., Raposo G.: Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2009; 21: 575-581
- [51] Singh P.P., Smith V.L., Karakousis P.C., Schorey J.S.: Exosomes isolated from mycobacteria-infected mice or cultured macrophages can recruit and activate immune cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.*, 2012; 189: 777-785
- [52] Skog J., Würdinger T., van Rijn S., Meijer D.H., Gainche L., Sena-Esteves M., Curry W.T. Jr., Carter B.S., Krichevsky A.M., Breakefield X.O.: Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.*, 2008; 10: 1470-1476
- [53] Smalley D.M., Ley K.: Plasma-derived microparticles for biomarker discovery. *Clin. Lab.*, 2008; 54: 67-79
- [54] Szajnik M., Czystowska M., Szczepański M.J., Mandapathil M., Whiteside T.L.: Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PLoS One*, 2010; 5: e11469
- [55] Tan A., De La Peña H., Seifalian A.M.: The application of exosomes as a nanoscale cancer vaccine. *Int. J. Nanomedicine*, 2010; 5: 889-900
- [56] Théry C., Boussac M., Véron P., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G., Garin J., Amigorena S.: Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol.*, 2001; 166: 7309-7318
- [57] Théry C., Zitvogel L., Amigorena S.: Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002; 2: 569-579
- [58] Trajkovic K., Hsu C., Chiantia S., Rajendran L., Wenzel D., Wieland F., Schwille P., Brügger B., Simons M.: Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 2008; 319: 1244-1247
- [59] Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O.: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.*, 2007; 9: 654-659
- [60] Valenti R., Huber V., Iero M., Filipazzi P., Parmiani G., Rivoltini L.: Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression. *Cancer Res.*, 2007; 67: 2912-2915
- [61] van Doormaal F.F., Kleinjan A., Di Nisio M., Büller H.R., Nieuwland R.: Cell-derived microvesicles and cancer. *Neth. J. Med.*, 2009; 67: 266-273
- [62] VanWijk M.J., VanBavel E., Sturk A., Nieuwland R.: Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.*, 2003; 59: 277-287
- [63] Vidal M., Sainte-Marie J., Philippot J.R., Bienvenue A.: Asymmetric distribution of phospholipids in the membrane of vesicles released during *in vitro* maturation of guinea pig reticulocytes: evidence precluding a role for "aminophospholipid translocase". *J. Cell. Physiol.*, 1989; 140: 455-462
- [64] Welton J.L., Khanna S., Giles P.J., Brennan P., Brewis I.A., Staffurth J., Mason M.D., Clayton A.: Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. *Mol. Cell. Proteomics*, 2010; 9: 1324-1338
- [65] Wolf P.: The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.*, 1967; 13: 269-288
- [66] Wubbolts R., Leckie R.S., Veenhuizen P.T., Schwarzmann G., Möbius W., Hoernschmeyer J., Slot J.W., Geuze H.J., Stoorvogel W.: Proteomic and biochemical analyses of human B cell derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 10963-10972
- [67] Wysoczynski M., Ratajczak M.Z.: Lung cancer secreted microvesicles: underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors. *Int. J. Cancer*, 2009; 125: 1595-1603
- [68] Zwaal R.F., Comfurius P., Bevers E.M.: Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1636: 119-128

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktów interesów.